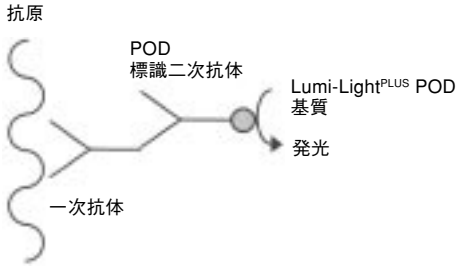
単品試薬として別売される製品

製品名	カタログ番号	製品の説明
Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrate	2 015 196	● ペルオキシダーゼの超高感度化学発光基質. ウェスタンブロット上の希少なタンパク検出用. ● ターゲットに特異的な一次抗体とペルオキシダーゼ標識二次抗体とともに用いる. ● 感度：1 ～5.0 pgのターゲットタンパク
Lumi-Light Western Blot Substrate	2 015 200	● ペルオキシダーゼの化学発光基質. ウェスタンブロット上の比較的量の多いタンパク検出用. ● ターゲットに特異的な一次抗体とペルオキシダーゼ標識二次抗体とともに用いる. ● 感度：10～50 pgのターゲットタンパク

2. 1 アッセイの概要

Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit（Mouse/Rabbit）を用いたノンラジオアクティブなタンパクの検出は，以下の実験ステージにより行われます.

ステージ	操作の説明[1]	所要時間
A	SDS，還元剤を用い，70℃に加熱して試料を変性させます.	10分間
B	変性されたタンパクを，アクリルアミド-SDSグラジエントゲルで200 Vで分離します. ***ノート：***Novex社から発売されているプレキャスト 4 ～12% NuPAGE BisTris gel（NP0321）およびNovex社が指定するゲル用バッファーの使用をお薦めします.	1時間
C	分離されたタンパクを25 Vでエレクトロブロッティングし，PVDFウェスタンブロッティング用メンブレンにトランスファーします. ***ノート：***ロシュ・ダイアグノスティックス社から発売されているPVDF Western Blottingメンブレン（Cat. No. 3 010 031）および，NuPAGE Transfer Buffer（NP0006）の使用をお薦めします.	1時間
D	● メンブレンをTBS（Tris buffered saline）で洗浄します. ● メンブレンを1%メンブレンブロッキング試薬[2]を用いてブロックし，非特異的な抗体の結合を防ぎます. ● メンブレンを洗浄用バッファー 2（TBST）[2]で手短に洗います.	2分間×2回 1時間 2分間×4回

ステージ	操作の説明[1]	所要時間
E	● 最適な濃度に希釈された特異的な一次抗体（マウスまたはウサギから生成されたもの）を用いて，ターゲットのタンパクを免疫検出します． ● 洗浄用バッファー2（TBST）[2] を使用し，結合しなかった抗体を除きます．	1時間 2分間×4回
F	● ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG[2] または抗ウサギIgG[2] を1：400に希釈したものを用い，一次抗体の局在を検出します． ● 洗浄用バッファー 2（TBST）[2] を使用し， 結合しなかった抗体を除きます．	30分間 2分間×4回
G	● Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrateの調製溶液（基質と増感剤との1：1混合液）[2]をメンブレンに加え，抗原-抗体の複合体を可視化させます．  ● 以下のいずれかの方法により， 化学発光シグナルを記録します： ● メンブレンをX-線フィルムに感光させます． ● イメージャー内で，化学発光シグナルを記録・定量します（第3章を参照）．	5分間 10〜20分間

1 ウェスタンブロッティング操作の詳細については，Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit（Mouse/Rabbit），Cat. No. 2 015 218の取扱説明書を参照ください．取扱説明書は弊社ウェブサイト（http：//www.roche-applied-science.com）からもご覧いただけます．

2 試薬はLumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit（Mouse/Rabbit）の内容物として含まれています．